

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>4</sup> :</b> <b>C07K 7/08, A61K 39/015</b> <b>C12N 15/00, G01N 33/569</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 88/ 05785</b> <b>(43) Date de publication internationale: 11 août 1988 (11.08.88)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00074</b> <b>(22) Date de dépôt international: 9 février 1988 (09.02.88)</b> <b>(31) Numéro de la demande prioritaire: 87/01543</b> <b>(32) Date de priorité: 9 février 1987 (09.02.87)</b> <b>(33) Pays de priorité: FR</b> <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTI- TUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F- 75724 Paris Cédex 15 (FR).</b> <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : MARCHAND, Claudine [FR/FR]; 44, rue de Fécamp, F-75012 Paris (FR). DRUILHE, Pierre [FR/FR]; 31, avenue Dau- mesnil, F-94160 Saint-Mande (FR). PUIJALON- MERCEREAU, Odile [FR/FR]; 11, boulevard Vol- taire, F-92130 Issy-les-Moulineaux (FR). LANGS- LEY, Gordon [GB/FR]; 51, rue Monsieur-le-Prince,</b>		<b>F-75006 Paris (FR).</b> <b>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; S.C. Ernest Gutmann - Yves Plasseraud, 67, bld. Haussmann, F- 75008 Paris (FR).</b> <b>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet euro- péen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</b>  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifica- tions sont reçues.</i>
<b>(54) Title: MOLECULES COMPRISING AT LEAST ONE PEPTIDIC SEQUENCE CARRYING ONE OR A PLU- RALITY OF EPITOPES CHARACTERIZING A PROTEIN PRODUCED BY P. FALCIPARUM IN HEPA- TOCYTES AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM</b>  <b>(54) Titre: MOLECULES COMPORTANT AU MOINS UNE SEQUENCE PEPTIDIQUE PORTEUSE D'UN, OU PLUSIEURS, EPITOPES CARACTERISTIQUES D'UNE PROTEINE PRODUITE PAR P. FALCIPARUM DANS LES HEPATOCYTES ET COMPOSITIONS LES CONTENANT</b>  <b>(57) Abstract</b> <p>Molecule comprising one or a plurality of peptidic sequences having the formula: Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X- Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg wherein X is Glu or Gly. It also relates to the implementation of said molecules in tests and kits for diagnosing <i>in vitro</i> paludism on a biological sample from the individual wherein the disease is to be de- tected.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Molécule comportant une ou plusieurs séquences peptidiques de formule: Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln- Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg dans laquelle X est Glu ou Gly. Elle concerne également la mise en œuvre de ces mo- lécules dans des essais et coffret ou kits de diagnostic <i>in vitro</i> du paludisme sur un échantillon biologique provenant de l'in- dividu chez qui la maladie est à dépister.</p>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

MOLECULES COMPORTANT AU MOINS UNE SEQUENCE PEPTIDIQUE  
PORTEUSE, D'UN, OU PLUSIEURS, EPITOPE CARACTERISTIQUE  
D'UNE PROTEINE PRODUITE PAR P.FALCIPARUM DANS LES  
5 HEPATOCYTES ET COMPOSITIONS LES CONTENANT.

Les parasites responsables du paludisme chez  
l'homme, dont notamment Plasmodium falciparum ou  
Plasmodium vivax pour ne citer que les principaux d'en-  
tre eux, présentent chez l'hôte humain des morphologies  
10 différentes et expriment des antigènes différents en  
fonction de leur localisation dans l'organisme de l'hôte  
infecté. Les différences morphologiques et antigéniques  
de ces parasites au cours de leurs cycles de vie chez  
l'homme, permettent de définir au moins quatre stades de  
15 développement distincts.

Le tout premier stade de développement du para-  
site chez l'homme correspond à la forme sporozoïte in-  
troduite dans le sang de l'hôte, par piqûres d'insectes  
porteurs du parasite. Le second stade correspond au pas-  
sage du parasite dans le foie et à l'infection des cel-  
lules hépatiques dans lesquelles les parasites se déve-  
loppent pour former les schizontes hépatiques qui libè-  
rent par éclatement les mérozoïtes hépatiques. Le troi-  
sième stade est caractérisé par l'infection des érythro-  
cytes sanguins par les formes asexuées (mérozoïtes) du  
25 parasite ; ce stade érythrocytaire de développement du  
parasite correspond à la phase pathogène de la maladie.  
Le quatrième stade correspond à la formation des formes  
sexuées (ou gamétocytes) qui deviendront les gamètes ex-  
tra-cellulaires chez le moustique.  
30

On sait que de nombreuses études ont été entre-  
prises pour isoler à partir des souches de parasites in-  
fectantes pour un hôte humain des fractions polypeptidi-  
ques, d'une part pour assurer le diagnostic in vitro du  
35 paludisme par détection des anticorps correspondants,

2

et, d'autre part, pour tenter de vacciner contre le paludisme,

Par exemple, des banques de cADNs clonés dérivés des sporozoïtes de Plasmodium falciparum ont été établies par ENEA et coll (1984) Science, vol. 225, 628-630. Il a été reconnu que ces banques comportaient des clones susceptibles d'exprimer des polypeptides immunogéniques contenant des unités répétitives de 4 acides aminés spécifiques de l'antigène circumsporozoïtaire (de P. falciparum).

Toutefois, peu de travaux ont été effectués sur les formes hépatiques des parasites responsables du paludisme. La morphologie des formes hépatiques a été décrite pour la première fois en 1948 à partir de biopsies de volontaires humains infectés (Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 41, 785 (1948)). Un antigène spécifique du stade hépatique de P. falciparum a pu être décrit dans le foie de singes d'Amérique du Sud insensibles aux formes sanguines du parasite, mais chez lesquels les formes hépatiques peuvent se développer (Am. J. Trop. Med. Hyg., 33, (3) 336-341 (1984)).

La détection de la localisation du ou des antigène(s) spécifique(s) du foie (ci-après désigné par LSA pour "Liver Specific Antigen") a été réalisée par immunofluorescence tout au long des étapes de maturation du schizonte. Il est localisé à la périphérie du parasite de taille 5 à 40 microns ; par la suite il est distribué entre les cytomères ou paquets de mérozoïtes, lorsque les schizontes atteignent entre 50 et 100 microns. Il se distingue des antigènes de surface des sporozoïtes et des antigènes partagés par les schizontes du sang et du foie qui donnent une image d'immunofluorescence interne au parasite.

3

Bien qu'il soit désormais possible de cultiver des formes hépatiques de P. falciparum dans des hépatocytes humains (Science, 227, 440 (1985)), le faible taux d'obtention de formes matures du parasite par les méthodes de culture in vitro et in vivo ne permet pas l'analyse biochimique de l'antigène produit au stade hépatique.

Il a également été observé que les individus atteints de paludisme possèdent un taux d'anticorps dirigés contre le LSA très élevé. Le LSA semble être un immunogène très puissant, parmi les plus puissants de tous les antigènes synthétisés aux différents stades de développement du parasite. Par contre, le taux d'anticorps dirigés contre les formes des stades sanguins du parasite est parfois très faible, et de ce fait le diagnostic réalisé à partir d'antigènes spécifiques des stades sanguins peut parfois être faussement négatif.

Un des buts de la présente invention est précisément de permettre le diagnostic in vitro de l'infection d'un individu par P. falciparum dans des conditions plus sensibles que ne le permettent les méthodes actuelles.

L'invention a également pour objet de nouvelles compositions pour la vaccination chez l'homme contre le paludisme provoqué par P. falciparum.

L'invention concerne plus particulièrement des molécules, ou compositions peptidiques ou polypeptidiques, caractérisées par la présence dans leur structure d'une ou de plusieurs séquences peptidiques porteuses d'un ou plusieurs épitopes caractéristiques de la protéine résultant de l'activité infectieuse de P. falciparum dans les cellules hépatiques, notamment de l'épitope B.

Une composition polypeptidique selon l'invention est essentiellement caractérisée par la présence d'une séquence de 17 acides aminés de formule :

4

Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg

dans laquelle :

X est Glu ou Gly

5 et dans laquelle "Leu" est la leucine, "Ser" est la sérine, "Lys" est la lysine, "Glu" est l'acide glutamique, "Gln" est la glutamine, "Asp" est l'acide aspartique, et "Arg" est l'arginine. Lorsque X est "Glu", on désignera dans la suite de ce texte le peptide correspondant par "peptide I", et lorsque X est "Gly" par "peptide II".

15 L'invention concerne en premier lieu des peptides monomères synthétiques comprenant une séquence peptidique unique de 17 acides aminés répondant respectivement à la formule sus-indiquée, et dont les acides aminés terminaux possèdent des extrémités respectivement amine et carboxylique libres, ou des oligomères contenant notamment des multiples de l'une quelconque des deux susdites séquences peptidiques I et II de 17 acides aminés.

20 Il va de soi que les fonctions réactives libres que sont susceptibles de posséder certains acides aminés entrant dans la constitution des molécules selon l'invention, notamment les groupes carboxyles libres portés par les groupes Glu ou par l'acide aminé C-terminal, d'une part, et/ou les groupes libres portés par l'acide aminé N-terminal ou par des acides aminés intérieurs à la chaîne peptidique, par exemple Lys, d'autre part peuvent être modifiées, dès lors que cette modification n'entraîne pas une modification des propriétés antigéniques, le cas échéant immunogéniques, de l'ensemble de la molécule. Les molécules ainsi modifiées entrent naturellement dans le cadre de la protection donnée à l'invention par les revendications. Ces fonctions carboxyles sont éventuellement acylées ou estérifiées.

D'autres modifications entrent également dans le cadre de l'invention. En particulier, fonctions amine ou ester, ou les deux à la fois, des acides aminés terminaux peuvent être engagées elles-mêmes dans des liaisons avec d'autres acides aminés. Par exemple l'acide N-terminal peut être lié à une séquence comprenant de 1 à plusieurs acides aminés correspondant à une partie de la région C-terminale d'un autre peptide conforme à la définition qui en a été donnée plus haut, ou vice-versa.

Il va de soi également que toute séquence peptidique issue de la modification, par substitution et/ou par addition et/ou suppression d'un ou plusieurs acides aminés, de l'une ou l'autre des deux séquences peptidiques I et II de 17 acides aminés, entre dans le cadre de la protection donnée à l'invention par les revendications, dès lors que cette modification n'altère pas les propriétés antigéniques ou immunogéniques des polypeptides I et II, notamment lorsque ces propriétés immunogéniques ont été renforcées de façon adéquate, par exemple par association de ces polypeptides I ou II avec un adjuvant immunologique approprié ( par exemple un muramylpeptide) ou par couplage avec une molécule porteuse de poids moléculaire plus élevé (par exemple une sérum-albumine ou une poly-lysine) ou une toxine du type tétanique ou un autre antigène de P.falciparum.

L'invention concerne plus généralement toute molécule caractérisée par la présence dans sa structure d'une ou plusieurs séquences peptidiques présentant des réactions immunologiques croisées avec les deux séquences peptidiques répondant à la formule précédente vis-à-vis des anticorps inductibles par ces dernières in vivo.

L'invention concerne aussi tout peptide, dont la structure découle de ceux qui ont été précédemment indiqués, par une permutation circulaire, d'un ou



6

plusieurs aminoacides. En particulier elle concerne aussi des peptides de formule :

Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu

5

Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala

10

Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys

Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu

15

Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys

Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu

20

X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln

25

Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-

Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln

30

Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-

Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-

35

7

Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp

5      Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu

Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu

10      Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln

Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Leu

15

dans lesquels X a la signification sus-indiquée.

Comme dans le cas du premier peptide sus-défini, les différents peptides qui viennent d'être nommés peuvent être modifiés sans pour autant sortir du cadre de l'invention, dès lors que ces modifications de structure n'entraîneraient pas des transformations profondes de leurs propriétés antigéniques.

20      Les peptides selon l'invention peuvent être préparés par les techniques classiques, dans le domaine de la synthèse des peptides. Cette synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide.

Par exemple, on aura recours à la technique de synthèse en solution homogène décrit par HOUBENWEYL dans l'ouvrage intitulé "Meuthode der Organischen Chemie" (Méthode de la Chimie Organique) édité par E. Wunsch, 30 vol. 15-I et II., THIEME, Stuttgart 1974.

Cette méthode de synthèse consiste à condenser successivement deux-à-deux les aminoacyles successifs dans l'ordre requis, ou à condenser des aminoacyles et 35 des fragments préalablement formés et contenant déjà

plusieurs aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces amino-acyles ou fragments, à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides. En variante, on pourra avoir recours à des réactions de couplage mettant en jeu des réactifs de couplage classique, du type carbodiimide, tels que par exemple la 1-éthyl-3-(3-diméthyl-amino-propyl)-carbodiimide. Lorsque l'aminoacycle mis en oeuvre possède une fonction acide supplémentaire (notamment dans le cas de l'acide glutamique), ces fonctions seront protégées, par exemple par des groupes t-butylester.

Dans le cas de la synthèse progressive, acide aminé par acide aminé, la synthèse débute de préférence par la condensation de l'amino-acide C-terminal avec l'aminoacide qui correspond à l'aminoacycle voisin dans la séquence désirée et ainsi de suite, de proche en proche, jusqu'à l'acide aminé N-terminal. Selon une autre technique préférée de l'invention, on a recours à celle décrite par R.D. MERRIFIELD dans l'article intitulé "Solid phase peptide synthesis" (J. Am. Soc., 45, 2149-2154).

Pour fabriquer une chaîne peptidique selon le procédé de MERRIFIELD, on a recours à une résine polymère très poreuse, sur laquelle on fixe le premier acide aminé C-terminal de la chaîne. Cet acide aminé est fixé sur la résine par l'intermédiaire de son groupe carboxylique et sa fonction amine est protégée, par exemple par le groupe t-butyloxycarbonyle.

Lorsque le premier acide aminé C-terminal est ainsi fixé sur la résine, on enlève le groupe protecteur de la fonction amine en lavant la résine avec un acide.

5 Dans le cas où le groupe protecteur de la fonction amine est le groupe t-butyloxycarbonyle, il peut être éliminé par traitement de la résine à l'aide d'acide trifluoroacétique.

On couple ensuite le deuxième acide aminé qui fournit le second amino-acyle de la séquence recherchée, à partir du résidu amino-acyle C-terminal sur la fonction amine déprotégée du premier acide aminé C-terminal fixé sur la chaîne. De préférence, la fonction carboxyle de ce deuxième acide aminé est activée, par exemple par la dicyclohexylcarbodiimide, et la fonction amine est protégée, par exemple par le t-butyloxycarbonyle.

10 On obtient ainsi la première partie de la chaîne peptidique recherchée, qui comporte deux acide aminés, et dont la fonction amine terminale est protégée. Comme précédemment, on déprotège la fonction amine et on peut ensuite procéder à la fixation du troisième aminoacyle, dans les conditions analogues à celles de l'addition du deuxième acide aminé C-terminal.

On fixe ainsi, les uns après les autres, les acides aminés qui vont constituer la chaîne peptidique sur le groupe amine chaque fois déprotégé au préalable de la portion de la chaîne peptidique déjà formée, et qui est rattachée à la résine.

25 Lorsque la totalité de la chaîne peptidique désirée est formée, on élimine les groupes protecteurs des différents acide aminés constituant la chaîne peptidique et on détache le peptide de la résine par exemple à l'aide d'acide fluorydrique.

L'invention concerne également les oligomères hydrosolubles des peptides monomères sus-indiqués.

35 L'oligomérisation peut provoquer un accroissement de

10

l'immunogénicité des peptides monomères selon l'invention. Sans qu'une telle indication chiffrée puisse être considérée comme limitative, on mentionnera néanmoins que ces oligomères peuvent, par exemple, contenir de 2 à 10 unités monomères.

Les unités monomères entrant dans cet oligomère sont soit toutes constituées par le polypeptide de séquence I ou par le polypeptide de séquence II, soit par l'un et l'autre de ces polypeptides.

On peut avoir recours, pour réaliser l'oligomérisation, à toute technique de polymérisation couramment utilisée dans le domaine des peptides, cette polymérisation étant conduite jusqu'à l'obtention d'un oligomère ou polymère contenant le nombre de motifs monomères requis pour l'acquisition de l'immunogénicité désirée.

Une méthode d'oligomérisation ou de polymérisation du monomère consiste dans la réaction de celui-ci avec un agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde.

On peut également avoir recours à d'autres méthodes d'oligomérisation ou de couplage, par exemple à celle mettant en jeu des couplages successifs d'unités monomères, par l'intermédiaire de leurs fonctions terminales carboxyle et amine en présence d'agents de couplage homo- ou hétéro- bifonctionnels.

On peut également pour la production de molécules comportant un ou plusieurs motifs de 17 acides aminés tels que définis ci-dessus, avoir recours à des techniques du génie génétique mettant en oeuvre des micro-organismes transformés par un acide nucléique déterminé comprenant des séquences nucléotidiques appropriées correspondantes.

A ce titre, l'invention concerne également des acides nucléiques contenant une ou plusieurs de ces séquences répétitives comprenant chacune 17 triplets du genre sus-indiqué.

L'invention concerne encore les conjugués obtenus par couplage covalent des peptides selon l'invention (ou des susdits oligomères) à des molécules porteuses (naturelles ou synthétiques), physiologiquement acceptables et non toxiques, par l'intermédiaire de groupements réactifs complémentaires respectivement portés par la molécule porteuse et le peptide. Des exemples de groupements appropriés sont illustrés dans ce qui suit :

A titre d'exemple de molécules porteuses ou supports macromoléculaires entrant dans la constitution des conjugués selon l'invention, on mentionnera des protéines naturelles, telles que l'anatoxine tétanique, l'ovalbumine, des sérums albumines, des hémocyanines, etc...

A titre de supports macromoléculaires synthétiques, on mentionnera par exemple des polylysines ou des poly(D-L-alanine)-poly(L-lysine).

La littérature mentionne d'autres types de supports macromoléculaires susceptibles d'être utilisés, lesquels présentent en général un poids moléculaire supérieur à 20 000.

Pour synthétiser les conjugués selon l'invention, on peut avoir recours à des procédés connus en soi, tels que celui décrit par FRANTZ et ROBERTSON dans Infect. and Immunity, 33, 193-198 (1981), ou celui décrit dans Applied and Environmental Microbiology, (octobre 1981), vol. 42, n° 4, 611-614 par P.E. KAUFFMAN en utilisant le peptide et la molécule porteuse appropriée.

Dans la pratique, on utilisera avantageusement comme agent de couplage les composés suivants, cités à titre non limitatif : aldéhyde glutarique, chloroformiate d'éthyle, carbodiimides hydrosolubles [N-éthyl-N'(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide, HCl], diisocyanates, bis-diazobenzidine, di- et trichloro-s-triazines, bromures de cyanogène, ainsi que les agents de

couplage mentionnés dans Scand. J. Immunol., (1978), vol. 8, p. 7-23 (AVRAMEAS, TERNYNCK, GUESDON).

On peut avoir recours à tout procédé de couplage faisant intervenir d'une part une ou plusieurs fonctions réactives du peptide et d'autre part, une ou plusieurs fonctions réactives de molécules supports. Avantageusement, il s'agit des fonctions carboxyle et amine, lesquelles peuvent donner lieu à une réaction de couplage en présence d'un agent de couplage du genre de ceux utilisés dans la synthèse des protéines, par exemple, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide, le N-hydroxybenzotriazole, etc... On peut encore avoir recours à la glutaraldéhyde, notamment lorsqu'il s'agit de relier entre eux des groupes aminés respectivement portés par le peptide et la molécule support.

Un groupe de molécules préférées selon l'invention est constitué de celles possédant une conformation en hélice  $\alpha$ , cette dernière renforçant les propriétés antigéniques, et immunogéniques desdites molécules. De telles molécules possédant une conformation en hélice  $\alpha$  ont été mise en évidence par dichroïsme circulaire dans le trifluoroethanol, ou en solution aqueuse.

Les molécules selon l'invention possèdent des propriétés antigéniques caractéristiques de l'antigène LSA spécifique du stade hépatique du développement de P. falciparum.

En effet, comme il le sera plus particulièrement décrit à l'aide d'exemples de molécules selon l'invention dans la description détaillée qui suit, les molécules selon l'invention réagissent spécifiquement avec les anticorps dirigés contre l'antigène LSA produit par P. falciparum, mais pas avec les anticorps dirigés contre d'autres antigènes produits par P. falciparum ou contre des antigènes produits par d'autres espèces de Plasmodium.

Ces molécules selon l'invention reconnaissent donc spécifiquement les anticorps produits par le système immunitaire d'un individu infecté par P. falciparum sous l'effet de l'antigène LSA dont le caractère  
5 fortement immunogène a été précédemment mentionné.

Ainsi la possibilité de production en grande quantité des molécules selon l'invention ainsi que leurs propriétés de reconnaissance spécifique des anticorps les plus activement produits lors de l'infection d'un  
10 individu par P. falciparum, font desdites molécules des réactifs de choix pour le diagnostic in vitro du paludisme chez un individu infecté par P. falciparum.

L'invention concerne donc un procédé de détection in vitro d'anticorps corrélables au paludisme issu  
15 de l'infection d'un individu par P. falciparum dans un tissu ou fluide biologique susceptible de les contenir, ce procédé comprenant la mise en contact de ce tissu ou fluide biologique avec une molécule selon l'invention dans des conditions permettant une réaction  
20 immunologique in vitro entre lesdites molécules et les anticorps éventuellement présents dans le tissu ou fluide biologique, et la détection in vitro du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

De préférence, le milieu biologique est constitué par un sérum humain.  
25

Toute procédure classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection.

A titre d'exemple une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique  
30 ELISA, ou immunofluorescents, ou radioimmunologiques (RIA) ou équivalent.

Ainsi l'invention concerne également toute molécule selon l'invention marquée à l'aide d'un marqueur adéquat du type enzymatique, fluorescent,  
35 radioactif, etc...



14

De telles méthodes comprennent par exemple les étapes suivantes :

- dépôt de quantités déterminées d'une composition polypeptidique selon l'invention dans les puits  
5 d'une microplaque de titration,
- introduction dans lesdits puits de dilutions croissantes du sérum devant être diagnostiqué,
- incubation de la microplaque,
- rinçages répétés de la microplaque,
- 10 - introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués contre des immunoglobulines du sang, le marquage de ces anticorps ayant été réalisé à l'aide d'une enzyme sélectionnée parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat en modifiant l'absorption des  
15 radiations de ce dernier, au moins à une longueur d'onde déterminée,
- détection, en comparaison avec un témoin de contrôle, de la quantité de substrat hydrolysé.

L'invention concerne également des coffrets ou  
20 kits pour le diagnostic in vitro du paludisme provoqué par P. falciparum qui comprennent :

- une composition polypeptidique selon l'invention,
- les réactifs pour la constitution du milieu  
25 propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection du complexe antigènes-anticorps produit par la réaction immunologique. De tels réactifs peuvent également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur  
30 tour par un réactif marqué. Plus particulièrement dans le cas où la composition polypeptidique sus-mentionnée n'est pas marquée.
- un tissu fluide biologique de référence dépourvu d'anticorps reconnus par la composition polypeptidique sus-mentionnée,  
35

15

L'invention concerne les anticorps eux-mêmes formés contre les polypeptides de l'invention.

Il va de soi que cette production n'est pas limitée aux anticorps polyclonaux.

5 Elle s'applique encore à tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir des cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisé contre l'un des polypeptides purifiés de  
10 l'invention, d'une part et des cellules d'une lignée de cellule myélome approprié d'autre part, et d'être sélectionné, par sa capacité à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant le polypeptide initialement mis en oeuvre pour l'immunisation des animaux, c'est-à-dire plus particulièrement le polypeptide I ou le polypeptide II.

15 L'invention ouvre enfin la voie à la mise au point de nouveaux principes vaccinnants contre le paludisme issu de l'infection d'un individu par P. falciparum.  
20

L'invention concerne également les compositions préparées sous forme de vaccins contenant soit le peptide selon l'invention, soit un oligomère de ce peptide, soit encore un conjugué de ce peptide ou oligomère avec  
25 une molécule porteuse, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié et, le cas échéant, avec d'autres principes actifs vaccinnants contre le paludisme.

Des compositions pharmaceutiques avantageuses  
30 sont constituées par des solutions, suspensions ou liposomes injectables contenant une dose efficace d'au moins un produit selon l'invention. De préférence, ces solutions, suspensions ou liposomes sont réalisés dans une phase aqueuse stérilisée isotonique, de préférence  
35 saline ou glucosée.

L'invention concerne plus particulièrement de telles suspensions, solutions ou forme liposome qui sont aptes à être administrées par injections intradermiques, intramusculaires ou sous-cutanées, ou encore par scarifications.

Elle concerne également des compositions pharmaceutiques administrables par d'autres voies, notamment par voie orale ou rectale, ou encore sous forme d'aérosols destinés à venir en contact avec des muqueuses, notamment les muqueuses oculaires, nasales, pulmonaires ou vaginales.

En conséquence, elle concerne des compositions pharmaceutiques dans lesquelles l'un au moins des produits selon l'invention se trouve associé à des excipients pharmaceutiquement acceptables, solides ou liquides, adaptés à la constitution de formes orales, oculaires ou nasales, ou avec des excipients adaptés à la constitution des formes d'administration rectale, ou encore avec des excipients gélatineux pour l'administration vaginale. Elle concerne aussi des compositions liquides isotoniques contenant l'un au moins des conjugués selon l'invention, adaptées à l'administration sur les muqueuses, notamment oculaires ou nasales.

Avantageusement, les compositions vaccinales selon l'invention contiennent en outre un véhicule, tel que la polyvinyl-pyrrolidone, facilitant l'administration du vaccin. A la place de la polyvinyl-pyrrolidone, on peut utiliser tout autre type d'adjuvant au sens classique que l'on donnait autrefois à cette expression, c'est-à-dire d'une substance permettant l'absorption plus aisée d'un médicament ou facilitant son action dans l'organisme. A titre d'exemples d'autres adjuvants de ce dernier type, on mentionnera encore la carboxyméthylcellulose, les hydroxydes et phosphates d'aluminium ou tous autres adjuvants de ce type, bien connus de l'homme

17

de l'art. Enfin elles contiennent si besoin un adjuvant immunologique, notamment du type muramylpeptide.

L'invention ne se limite évidemment pas aux modes de réalisation décrits ci-dessus à titre d'exemples et l'homme de l'art peut y apporter des modifications sans pour autant sortir du cadre des revendications ci-après ; notamment certains des acides aminés intervenant dans la séquence des peptides selon l'invention peuvent être remplacés par des acides aminés isofonctionnels ou

10

15

20

25

30

35

18

isostériques ; par exemple, une ou plusieurs des substitutions suivantes peuvent être envisagées :

- Glu est substitué par Asp ou Gln,
- Leu est remplacé par Ala, etc...

5 Il est naturellement bien entendu que les peptides qui résultent de telles substitutions consistent en des équivalents des peptides plus particulièrement revendiqués, dès lors qu'eux-mêmes ou des oligomères ou conjugués formés à partir de ces peptides présentent des propriétés immunogéniques semblables.

10 L'invention concerne également encore plus particulièrement les "protéines chimères" qui peuvent être obtenues par les techniques du génie génétique, ces protéines chimères pouvant contenir une ou plusieurs séquences peptidiques, comportant respectivement les 17 acides aminés des séquences de l'invention, et incorporées ou rattachées à un fragment peptidique autre que la  $\beta$ -galactosidase. Ce dernier fragment peptidique a de préférence un poids moléculaire suffisant pour renforcer l'immunogénicité des séquences peptidiques selon l'invention et n'interfère pas du point de vue immunologique avec la manifestation de l'immunogénicité recherchée.

20 Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore, au cours de la description qui suit, des conditions dans lesquelles un polypeptide contenant une pluralité de séquences de 17 acides aminés selon l'invention a été obtenu.

Il sera fait référence dans ce qui suit aux dessins dans lequel

30 - la figure 1 fournit la séquence nucléotidique d'un des acides nucléiques recombinants étudiés (clone DG 307) lequel contient lui-même une séquence spécifique codant pour un polypeptide caractéristique des formes hépatiques de P. falciparum ;

35

19

- la figure 2 fournit la séquence en acides aminés codée pour la susdite séquence nucléotidique spécifique.

Des sérums provenant d'individus européens vivant dans des zones endémiques et suivant une prophylaxie continue avec des médicaments dirigés contre les schizontes des stades sanguins ont été sélectionnés et testés en utilisant des antigènes du stade des sporozoïtes (antigènes CS), du stade hépatique (antigène LSA), et des stades sanguins. La plupart de ces sérums réagissent avec les antigènes de tous les stades probablement car la prophylaxie a été interrompue. Trois sérums prélevés à partir d'individus ayant résidé en Afrique tropicale rurale et ayant ingéré 100 µg de chloroquine par jour sans interruption pendant 23 à 26 ans, ne réagissent pas avec les antigènes des stades sanguins suivant le test d'immunofluorescence (IFA). Ces trois sérums possédant toutefois des titres élevés en anticorps dirigés contre les sporozoïtes et les protéines LSA (dilution IFA 1/3200 et 1/6400 respectivement).

Un des trois sérums précédents, de spécificité réduite, a été utilisé pour cribler une banque d'ADN génomique construite dans le bactériophage λ gt 11 de la manière suivante :

1) CONSTRUCTION DE LA BANQUE D'ADN GENOMIQUE DE Plasmodium falciparum.

L'ADN génomique du clone 96 de la souche thaïlandaise Tak9 de P.falciparum (Science, 212, 1.37-1.38 (1981) a été isolé par les techniques classiques.

Des échantillons de 18 µg d'ADN de P.falciparum ont été incubés à 15°C dans un tampon 50 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 20 µg/ml de sérum albumine bovine, avec des quantités respectives d'ADNase I (Boehringer Mannheim) de 5 pg pendant 5 minutes ou bien de 3.5 pg

20

pendant 5 ou 10 minutes. Après addition de 5 mM EDTA (Ethylènediamine tetracétique acide), les échantillons d'ADN sont réunis et purifiés par extraction au mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 V/24 V/1 V) puis par l'éther. L'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol à -20°C en présence de 2.5 M d'acétate d'ammonium.

45 µg d'ADN ainsi traité ont été méthylés par 180 U d'Eco R1 méthylase (Biolabs) dans les conditions recommandées par le fournisseur, avec l'addition supplémentaire de 5 mM DTT (dithiothreitol), pendant 15 minutes à 37° C. Après purification de l'ADN comme ci-dessus, 10 µg d'ADN ont été incubés avec 40 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM sulfate d'ammonium, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, 0.05 mM NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) 0.1 mM dXTP (comprenant les 4 desoxynucleotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP), en présence de 10 U T4 ADN polymérase (PL Biochemicals) et de 10 U de E. coli ADN ligase (Biolabs). L'ADN a été purifié et concentré comme ci-dessus.

8 µg d'ADN ont alors été ligaturés avec 0.4 µg d'un adaptateur ou "linker" Eco R1 (adaptateurs phosphorylés Eco R1 commercialisés par Biolabs) par 4 U T4 ADN ligase (Biotec) dans le tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml sérum albumine bovine.

Après incubation à 4° C pendant 5 heures, on ajoute 2 U T4 ADN ligase et la réaction est poursuivie à 4° C pendant 16 heures. Le tube est soumis à plusieurs cycles de congélation à -80° C / décongélation pour arrêter la réaction. L'ADN est ensuite dilué et le tampon d'incubation ajusté de façon à obtenir les conditions recommandées par le fournisseur pour l'utilisation de l'enzyme Eco R1. 100 U d'enzyme Eco R1 (Promega Biotec) sont ajoutées et incubées pendant 3 heures à

21

37°C. La réaction est arrêtée par un chauffage de 10 minutes à 60°C, et l'ADN est purifié et concentré comme ci-dessus.

L'ADN est resuspendu dans 100 µl de tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, et déposé sur un gradient 5-20 % de saccharose préparé en 25 mM acétate de sodium, 10 mM EDTA et centrifugé dans le rotor Beckman SW 50.1 à 45,000 tours par minute pendant 150 minutes. Les fractions sont analysées sur gel d'agarose et celles qui contiennent les fragments d'ADN de tailles comprises entre environ 300 pb. et 2 500 pb. sont rassemblées, dialysées contre le tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA à 4°C. L'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol. Environ 400 ng de cet ADN ont été ligaturés à 1 µg d'ADN du vecteur gt11 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 1194-1198 (1983)) coupé par Eco R1 et déphosphorylé (Proclone de Promega Biotec), dans un volume de 10 µl, (en tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml sérum albumine bovine) par 1 U T4 ADN ligase (Biotec).

Les produits de ligature ont été encapsidés in vitro dans les extraits d'E. coli préparés à partir des souches bactériennes construites par B. Hohn (Methods Enzymol. 68, 299), selon la technique décrite par Maniatis et coll. (Molecular cloning, a laboratory manual, p. 264, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Environ 7 millions de bactériophages recombinants ont été obtenus.

## 2) CRIBLAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA BANQUE

Les bactériophages recombinants ont été étalés sur un milieu de culture contenant la bactérie indicatrice Y 1090, à une densité de 50,000 plages par boîte de Pétri de 90 mm, et incubés à 42°C pendant 3 heures. Un filtre de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, BA

35



22

85) saturé par 0,01 M IPTG isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside (Sigma) est déposé sur les boîtes, qui sont incubées à 37°C pendant 3 heures. Au terme de ces incubations, les filtres de nitrocellulose sont  
5 prélevés, et les boîtes de Pétri conservées à 4° C.

Les filtres de nitrocellulose sont placés dans un bain de tampon TL : 50 mM tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 % lait écrémé, 0.05 % Tween 20 (Sigma). Les filtres sont incubés 15 heures à 4° C en tampon TL, puis  
10 2 fois 15 minutes à 20° C. Ils sont alors incubés pendant une heure avec un pool d'antisérums humains immuns dirigés contre les antigènes de tous les stades de développement de P. falciparum, traité au préalable pour le dépléter en anticorps anti-E.coli selon la technique  
15 décrite par Ozaki et coll. (J. Immunol. Methods, 89, 213-219, 1986). Le pool d'antisérums humains a été utilisé à la dilution 1/200, en tampon TL. L'incubation a été faite à 20°C pendant 1 heure. Les filtres ont été lavés 4 fois avec le tampon TL, puis incubés avec des  
20 anticorps anti-immunoglobulines humaines conjugués à la peroxydase de raifort (Biosys) et iodines à l'iode  $^{125}\text{I}$ , pendant 1 heure à 20° C. Après plusieurs lavages en tampon TL, puis en tampon 50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, l'activité enzymatique de la peroxydase est révélée (Ozaki et coll, précédemment cité), les filtres sont  
25 séchés à l'air libre et autoradiographiés sur film Kodak Royal X-OMat AR, avec un écran amplificateur.

Une collection d'environ 1 200 clones de bactériophages recombinants a été constituée en prélevant les  
30 plages de lyse correspondant aux signaux positifs. Ces clones ont été ensuite soumis à un second cycle de criblage immunologique, en employant cette fois un des trois sérums humains précédemment décrits (p.16 et 17) et présentant pas ou peu d'anticorps dirigés contre les  
35 formes érythrocytaires de P. falciparum et un titre

23

élevé contre les formes hépatiques du parasite. Ce criblage immunologique a été effectué selon le protocole décrit ci-dessus. Ce sérum réagit avec seulement 15 % des clones producteurs d'un antigène spécifique de P.falciparum (60 sur 400 testés) et parmi les clones les plus actifs, 22 ont été sélectionnés et caractérisés comme suit.

Les anticorps humains qui réagissent avec les déterminants antigéniques exprimés par les clones recombinants ont été purifiés par affinité sur les protéines recombinantes, selon la technique décrite par Ozaki et coll. (précédemment cité). Ces anticorps spécifiques ont été incubés avec des préparations de parasites à différents stades de développement (sporozoïte, stade hépatique ou stades érythrocytaires), et la réaction a été étudiée par immunofluorescence indirecte. Les clones recombinants sur lesquels sont retenus par affinité des anticorps spécifiques du stade hépatique, et donc qui expriment des déterminants propres à ce stade ont été étudiés : il s'agit des clones DG 307, DG 199 et DG 145. Ces anticorps spécifiques de ces trois clones réagissent spécifiquement avec les schizontes hépatiques, tels que l'on peut les obtenir après infection d'hépatocytes humains ou de singes par des sporozoïtes de P.falciparum ; la localisation de la fluorescence a été déterminée comme étant identique à celle considérée caractéristique de LSA.

La spécificité d'espèce et de stade des 3 clones DG 145, DG 199, et DG 307 a été testée de la manière suivante. Premièrement, il a été déterminé que les mêmes anticorps purifiés par affinité et qui réagissent par IFA (ou encore qui sont IFA positifs) avec LSA, ne réagissent pas avec des préparations de sporozoïtes sèches ou humides, ni avec les antigènes des stades sanguins, qu'ils soient testés par IFA avec des parasites fixés à

l'acétone, ou par immunotransfert (immunoblotting) en utilisant des protéines de tous les stades extraites au SDS. Les anticorps purifiés par affinité ne réagissent pas avec les antigènes de stade hépatique de P. yoelii,  
5 ni avec les schizontes hépatiques de P. vivax préparés à partir de singes Saimiri sciureus.

Deuxièmement, les protéines recombinantes de DG 145, DG 199 et DG 307 ne réagissent pas avec les sérums provenant de deux patients atteints de malaria (palu-  
10 disme causé par P. falciparum) par transfusion accidentelle et qui, par définition n'ont donc pas d'anticorps contre les antigènes spécifiques des stades précédents (sporozoïtes et antigènes du stade hépatique). Ces protéines ne réagissent pas avec deux anticorps monoclonaux  
15 reconnaissant le tétrapeptide CS, avec les sérums de souris immunisées avec les antigènes CS recombinants R32t et 32 (Science, 228, 958 (1985)). De plus, les protéines recombinantes n'ont pas réagi avec des antisérums humains dirigés contre P. vivax (bien que les  
20 sérums furent positifs avec les schizontes hépatiques de P. vivax), P. ovale et P. cynomolgi (Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 60, 348 (1980)) quand elles sont testées par la technique de taches d'immunotransfert (immunodot blots), alors qu'elles sont positives avec tous les  
25 sérums humains anti-P. falciparum testés.

La stabilité à la chaleur, connue comme étant une caractéristique du LSA mature (Ann. J. Trop. Med. Hyg., 33 (3) 336-341 (1984)) a également été démontrée pour la protéine de fusion produite par le clone DG 307.  
30 Elle demeure antigéniquement active après un traitement de 15 minutes à 100°C. Pour cette raison le clone DG 307 a été analysé plus en détail.

L'insérat de 196 paires de bases de P. falciparum a été purifié et recloné à l'intérieur du plasmide  
35 pUC13 et du bactériophage M13 mp 8 (Nucleic Acids

25

Research, 9, 309-321 (1981)) . La séquence d'ADN et l'organisation génomique du gène LSA ont alors été déterminées. La figure 1 montre que le clone DG 307 contient un fragment d'ADN composé entièrement de  
5 répétition d'un motif de 51 paires de bases.

Seulement une phase de lecture est en phase avec le gène lac Z de la  $\beta$ -galactosidase, une caractéristique attendue puisque le clone produit une protéine de fusion qui porte les épitopes reconnues par le sérum humain. La  
10 séquence en acides aminés correspondant à ce fragment est représentée à la figure 2. Elle est composée d'une répétition de 17 acides aminés riche en glutamine, acide glutamique, et leucine. L'analyse informatique de cette séquence indique qu'elle a une grande probabilité de pos-  
15 séder une structure en hélice  $\alpha$  sans pli  $\beta$ . De plus, aucune homologie entre les séquences d'ADN connues à l'heure actuelle et la séquence d'ADN codant pour ladite protéine n'a été détectée par analyse des banques de données Los Alamos et NBRF. Ceci est en accord avec la  
20 spécificité du stade hépatique de la protéine LSA.

Des analyses par transfert selon la méthode de Southern utilisant le fragment de 196 paires de bases cloné dans pUC 13 indiquent que ce fragment est un dé-  
rivé d'un gène unique puisqu'il s'hybride à des frag-  
25 ments uniques Eco RI (6,5 kb) et Dra I (4,5 kb). Le gène semble être polymorphe, car des fragments Rsa I de différentes tailles ont été observés lorsque de l'ADN provenant d'une autre souche a été utilisé. Le gène a été trouvé dans toutes les souches de P. falciparum  
30 examinées jusqu'à maintenant, localisé sur un des plus grands chromosomes. Les études d'hybridation d'ADN indiquent que les trois clones DG 307, 145, et 199 sont des fragments séparés dérivés du même gène.

26

Le type de répétition codée par DG 307 semble être conservé et implique que le ou les épitopes correspondant pourraient être présents chez toute les souches de P. falciparum. Ceci est en accord avec l'observation du fait que le gène qui est dérivé de la souche Thai Tak9.96 a été détecté en utilisant du sérum humain d'Afrique ou de personnes immunisées par les souches africaines.

Comme les épitopes répétitifs apparaissent être une caractéristique générale des antigènes de P. falciparum (Nature, 306, 751-756 (1983) ; Nature, 311, 382-385 (1984) ; Science, 225, 593-599 (1984) ; Science, 227, 1595-1597 (1985) ; Cell, 40, 775-783 (1985)), il n'est pas surprenant que le LSA qui est hautement immunogène chez l'homme possède également des structures répétitives. La forte réaction du clone DG 307 avec les antisérums humains indique que l'épitope naturel est défini par moins de 4 répétitions.

La relation entre le, ou les, épitope(s) exprimé(s) par la protéine recombinante de DG 307, et les épitopes présents dans la protéine mature du stade hépatique, a été étudiée de la manière suivante : 10 sérums humains provenant de Côte d'Ivoire, Gabon et Zaïre, possédant des titres élevés en anticorps dirigés contre ladite protéine mature ont été ajustés à des dilutions présentant une nette réaction positive IFA avec les antigènes du stade hépatique. Par la suite, ces sérums ont été incubés soit en présence de l'extrait protéique du clone DG 307 induit par l'IPTG, soit avec des protéines provenant de deux autres clones exprimant des déterminants antigéniques des stades sanguins. Les concentrations des antigènes ont été ajustées à un niveau de réactivité similaire au précédent en testant plusieurs dilutions par immunodot blots et en révélant

27

l'anticorps lié en utilisant un pool de sérums hyper-immuns. Après incubation pendant 2 heures à température ambiante, la spécificité pour les schizontes hépatiques des différentes solutions a été testée par IFA. Les résultats indiquent que les anticorps préincubés avec l'extrait de DG 307 n'ont plus aucune réactivité IFA, alors que ceux incubés avec les deux autres extraits n'ont pas vu leur activité contre l'antigène hépatique diminuer.

Il semble donc que le DG 307 code pour l'épitope principal du LSA puisque dans ces expériences d'absorption, la réactivité IFA à la protéine mature a été abolie pour 9 des 10 sérums humains testés, alors qu'aucune diminution de l'activité IFA, n'a été observée après pré-incubation de ces mêmes 10 sérums en présence de protéines recombinantes différentes de celles de DG 307.

L'invention concerne encore les acides nucléiques recombinants contenant l'une au moins des séquences polypeptidiques I ou II, ou les deux à la fois, ainsi que les micro-organismes, notamment les bactéries E.coli transformées par ces acides nucléiques recombinants et capables d'exprimer lesdits polypeptides.

L'invention concerne ces séquences d'acides nucléiques ou des séquences équivalentes qui peuvent être synthétisées et qui codent pour les mêmes acides aminés.

Il apparaîtra immédiatement à l'homme de métier que dans ces séquences, certains des nucléotides peuvent être remplacés par d'autres en raison de la dégénérescence du code génétique sans que pour autant les peptides codés ne soient modifiés. Toutes ces séquences nucléotidiques, ainsi que celles qui codent pour des polypeptides qui diffèrent des précédents par un ou plusieurs acides aminés sans que leur activité immunogénique propre ne soit modifiée de façon semblable, font partie de l'invention. Il en va naturellement de même

28

des séquences nucléotidiques qui peuvent être reconstituées et qui sont capables de coder pour des oligomères tels qu'ils ont été définis plus haut. Les motifs monomères sont liés directement bout à bout ou par l'intermédiaire de séquences peptidiques sans effet sur les propriétés immunogéniques des oligomères ainsi formés.

Enfin, l'invention concerne les vecteurs modifiés par ces micro-organismes, ces vecteurs étant naturellement pourvus de régulation et de terminaison précédant et suivant les séquences nucléiques sus-indiquées, qui permettront l'expression de ces dernières dans des organismes cellulaires compétents.

Parmi les séquences nucléotidiques qui codent pour les peptides caractéristiques qui ont été définis ci-dessus, on mentionnera celles qui sont caractérisées par les séquences de triplets qui suivent, ces séquences correspondant en particulier pour les trois premières au peptide I et pour la dernière au peptide II dont les formules ont été précédemment indiquées. (étant entendu que les nucléotides qui sont remplacés par des points dans les séquences ci-après sont identiques à ceux de la première séquence à l'aplomb duquel ils se trouvent).

(1) CTT GCT AAA GAA AAG TTA CAA GAG CAG CAA AGC CAT TTA GAA CAA GAG AGA  
 (2) ... ..G ... ..A ..A ... ..C.. ... ..  
 (3) ... ..G ... ..A ..A ... ..  
 (4) ..A ... ..G ..G. ..A ... ..C.. ... ..

Des bactéries hébergeant les susdits clones DG 199 et DG 307 ont été déposées à la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM), le 22 juillet 1986 respectivement sous les numéros I-580 et I-581. Des bactéries DG 145 ont été déposées le 15 septembre 1986 sous le numéro I-606.

35

REVENDICATIONS

1. Molécule, ou composition polypeptidique, comportant au moins une séquence peptidique porteuse d'un, ou plusieurs, épitope caractéristique d'une protéine produite dans les hépatocytes infectés par P. falciparum, caractérisée en ce que cette séquence peptidique est représentée par la formule :

Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg

dans laquelle :

X est "Glu" (séquence peptidique I), ou "Gly" (séquence peptidique II).

2. Molécule selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un peptide monomère contenant 17 acides aminés, ce peptide contenant l'une ou l'autre des deux susdites séquences I et II.

3. Molécule selon la revendication 1, ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un peptide de 17 acides aminés dont la structure correspond à l'une ou l'autre des deux susdites séquences I et II.

4. Molécule selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient plusieurs séquences peptidiques répétitives correspondant à l'une ou l'autre seulement, ou aux deux séquences I et II sus-indiquées.

5. Molécule dérivée de celle selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, par l'intermédiaire d'une permutation circulaire, notamment choisie parmi :

Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu

Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala



30

Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-  
Leu-Ala-Lys

5 Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-  
Ala-Lys-Glu

Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-  
Lys-Glu-Lys

10 Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-  
Glu-Lys-Leu

X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-  
Lys-Leu-Gln

15 Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-  
Leu-Gln-X-

20 Gln-Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-  
Gln-X-Gln

Ser-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-  
X-Gln-Gln-

25 Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-  
Gln-Gln-Ser-

Leu-Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-  
Gln-Ser-Asp

30 Glu-Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-  
Ser-Asp-Leu

35 Gln-Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-  
Asp-Leu-Glu

Glu-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-  
Leu-Glu-Gln

- 5 Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Lys-Leu-Gln-X-Gln-Gln-Ser-Asp-Leu-  
Glu-Gln-Leu  
dans lesquels X est un résidu Glu ou Gly

6. Molécule selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est constituée  
10 par un oligomère d'une ou des deux séquences peptidiques I et II sus-indiquées.

7. Molécule selon l'une quelconques des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est fixée à un support.

15 8. Composition immunogène caractérisée par l'association d'une molécule conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

9. Composition de vaccin dirigée contre le paludisme, contenant entre autres principes immunogènes, une  
20 molécule conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10. Séquence de nucléotides codant pour une ou l'autre des séquences peptidiques I et II définies dans  
25 la revendication 1.

11. Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P. falciparum qui comprend la mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu avec une  
30 composition polypeptidique selon les revendications 1 à 10 dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre ladite composition polypeptidique et les anticorps éventuellement présents dans le tissu biologique, et la détection in vitro du complexe anti-gène-anticorps éventuellement formé.  
35

32

12. Coffret ou kit pour le diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P. falciparum qui comprend :

- une composition polypeptidique selon les revendications 1 à 10,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection du complexe antigènes-anticorps produit par la réaction immunologique. De tels réactifs peuvent également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où la composition polypeptidique sus-mentionnée n'est pas marquée.

13. Les anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, qui reconnaissent spécifiquement les séquences peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

14. Les ADNs codant pour les polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

15. Les ADNs recombinants contenant l'un au moins des ADNs de la revendication 14.

25

30

35

1/2

SEQUENCE D'ADN CONTENUE DANS LE CLONE 307

GAATTCC-GACTTGCTAAAGAAAAGTTACAAGAGCAGCAAAGCGATTTTAGAAACAAGAGAGAAdaptateur Eco RICTTGCTAAAGAAAAGTTGCAAGAACAAACAAGCGATCTAGAAACAAGAGAGA  
Sau3ACTAGCTAAAGAAAAGTTACAGGGGCAACAAAGCGAICTAGAAACAAGAGAGA  
AluICTTGCTAAAGAAAAGTTGCAAGAACAAACAAGCGATTTTAGA-GAATTCCAdaptateur Eco RI

figure 1

2 / 2

## SEQUENCE D'AMINOACIDES CONTENUE DANS LE CLONE 307

Adaptateur Eco RIGAA TTC CGA

glu phe arg leu ala lys glu lys leu gln glu gln gln ser asp leu glu gln glu arg

leu ala lys glu lys leu gln glu gln gln ser asp leu glu gln glu arg

leu ala lys glu lys leu gln gly gln gln ser asp leu glu gln glu arg

leu ala lys glu lys leu gln glu gln gln ser asp leu glu

GAG AAT TCCAdaptateur Eco RI

figure 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 88/00074

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *	
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC	
Int.Cl. <sup>4</sup> : C 07 K 7/08; A 61 K 39/015; C 12 N 15/00; G 01 N 33/569	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>	
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>	
Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. <sup>4</sup> : A 61 K; C 12 N; G 01 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *	
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *	
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>
	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	Biological Abstracts, vol. 78, No: 8, 1984, (Philadelphia,US), P. Druilhe et al.: "Species-specific and stage-specific antigens in exoerythrocytic stages of Plasmodium falciparum", see page 6756, abstract 59971, & Am. J. Trop. Med. Hyg. 33(3): 336-341, 1984 (cited in the application)
	--
Y	Biological Abstracts, vol. 67, No: 8, (Philadelphia,US), Q.Z. Hussain et al.: "Vaccine against malaria in rodents: A preliminary communication", see page 4780, abstract 47958, & Indian J. Med. Res. 64(12), 1836-1840, 1976
	--
Y	WO, A, 84/02917 (WALTER & ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 2 August 1984, see the whole document
	--
A	Biological Abstracts, vol. 67, No: 8,
	1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>	
<b>IV. CERTIFICATION</b>	
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
26 April 1988 (26.04.88)	3 June 1988 (03.06.88)
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer
European Patent Office	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	(Philadelphia, US), Q.Z. HUSSAIN et al.: "Vaccine against simian malaria (P. cynomolgi): A preliminary communication", see page 4780, abstract 47957, & Indian J. Med. Res. 64(12): 1841-1843, 1976 --	
A	Science, vol. 234, 12 December 1986, L.H. Miller et al.: "Research toward malaria vaccines", pages 1349-1356 --	
P,X	Nature, vol. 329, No: 6135, 10-16 September 1987, (Basingstoke, Hants., GB), C. Guerin-Marchand et al.: "A liver-stage-specific antigen of Plasmodium falciparum characterized by gene cloning", pages 264-267 see the whole document -----	1-15

FR 8800074  
SA 20854

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8402917	02-08-84	AU-A- 2384284	09-08-84
		GB-A, B 2143830	20-02-85
		EP-A- 0134799	27-03-85
		JP-T- 60500478	11-04-85
		OA-A- 7823	20-11-86
-----			



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00074

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <b>CIB<sup>4</sup>:</b> C 07 K 7/08; A 61 K 39/015; C 12 N 15/00; G 01 N 33/569		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
<b>CIB<sup>4</sup></b>	A 61 K; C 12 N; G 01 N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>6</sup>	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
Y	Biological Abstracts, volume 78, no. 8, 1984, (Philadelphia, US), P. Druilhe et al.: "Species-specific and stage-specific antigens in exoerythrocytic stages of Plasmodium falciparum", voir page 6756, résumé 59971, & Am. J. Trop. Med. Hyg. 33(3): 336-341, 1984 cité dans la demande	1,7-9,11-13
Y	Biological Abstracts, volume 67, no. 8, (Philadelphia, US), Q.Z. Hussain et al.: "Vaccine against malaria in rodents: A preliminary communication", voir page 4780, résumé 47958, & Indian J. Med. Res. 64(12), 1836-1840, 1976	1,7-9,11-13
Y	WO, A, 84/02917 (WALTER & ELIZA HALL INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 2 août 1984 voir le document en entier	1,7-9,11-13
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p><sup>6</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  26 avril 1988	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  03 JUN 1988	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé P.C. VAN DER PUTTEN	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Biological Abstracts, volume 67, no. 8, (Philadelphia, US), Q.Z. Hussain et al.: "Vaccine against simian malaria (P. cynomolgi): A preliminary communication", voir page 4780, résumé 47957, & Indian J. Med. Res. 64(12): 1841-1843, 1976 --	1
A	Science, volume 234, 12 décembre 1986, L.H. Miller et al.: "Research toward malaria vaccines", pages 1349-1356 --	
P,X	Nature, volume 329, no. 6135, 10-16 septembre 1987, (Basingstoke, Hants., GB), C. Guerin-Marchand et al.: "A liver-stage-specific antigen of Plasmodium falciparum characterized by gene cloning", pages 264-267 voir le document en entier -----	1-15

FR 8800074  
SA 20854

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 19/05/88.

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8402917	02-08-84	AU-A- 2384284	09-08-84
		GB-A, B 2143830	20-02-85
		EP-A- 0134799	27-03-85
		JP-T- 60500478	11-04-85
		OA-A- 7823	20-11-86
-----			

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82